

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. November 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/098635 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/49**,
38/57, A61P 25/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/004776

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Mai 2004 (05.05.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 37 098.6 5. Mai 2003 (05.05.2003) DE
103 20 336.2 6. Mai 2003 (06.05.2003) DE
103 52 333.2 6. November 2003 (06.11.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): PAION GMBH [DE/DE]; Martinstrasse 10 - 12,
52062 Aachen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SÖHNGEN, Wolf-
gang; Von-Coels-Strasse 156, 52080 Aachen (DE).

(74) Anwälte: KÖNIG, Reimar usw.; Lohengrinstr. 11, 40549
Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GLUTAMATE RECEPTOR ANTAGONISTS AS NEUROPROTECTIVES

(54) Bezeichnung: GLUTAMAT-REZEPTOR-ANTAGONISTEN ALS NEUROPROTEKTIVA

(57) Abstract: The invention relates to the use of an inhibiting agent of t-PA of mediated activation of the glutamate receptor,
preferably of the NMDA type, as neuroprotectives.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Hemmstoffs der t-PA vermittelten Aktivierung des Glutamat-
Rezeptors, vorzugsweise des NMDA-Typs, als Neuroprotektivum.



WO 2004/098635 A1

GLUTAMAT-REZEPTOR-ANTAGONISTEN ALS NEUROPROTEKTIVA

Die Erfindung betrifft Neuroprotektiva für die Therapie und Prophylaxe neurologischer Schädigungen, insbesondere von Schädigungen, die auf die Überaktivierung des Glutamat-Rezeptors des methyl-D-aspartat-Typs (nachfolgend NMDA-Glutamat-Rezeptor) mittelbar oder unmittelbar zurückzuführen sind und nimmt die Priorität der deutschen Patentanmeldungen 103 37 098.6, 103 20 336.2 und 103 52 333.2 in Anspruch, auf die inhaltlich Bezug genommen wird.

Unter dem Begriff der "Neuroprotektiva" werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Therapeutika oder Wirkstoffe verstanden, die dazu beitragen, Nervenzellen vor Zellschädigung zu schützen und/oder neurodegenerativen Prozessen sowie Beeinträchtigungen der neuronalen Leistung entgegenzuwirken.

Bei der Entwicklung von Neuroprotektiva sind wesentliche Anstrengungen insbesondere auf die Identifikation und/oder die Weiterentwicklung von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten gerichtet, die die Nervenzellen gegen eine erhöhte Aktivität erregender Neurotransmitter-Rezeptoren (Exzitotoxizität) schützen oder die Überaktivierung mildern. Die wichtigste Gruppe der Rezeptor-Antagonisten sind die NMDA-Antagonisten, die den NMDA-Typ des Glutamatrezeptors hemmen. Dabei wird zwischen folgenden Agonisten unterschieden: kompetitive NMDA-Antagonisten wie 2-Amino-5-phosphonopentanoat ((D)-AP5) und (+/-)-4-(4-Phenylbenzoyl)-piperazin-2,3-dicarboxylsäure (PBPB), die an der Glutamat-Bindestelle wirken, NMDA Rezeptor Kanal-Blockern wie MK-801, Memantin und Ketamin, die den Ionenkanal des Rezeptors blockieren, den an der Glycin-Bindestelle wirkenden NMDA-Antagonisten wie GV96771A, die die Bindung des Co-Agonisten Glycin hemmen und den Polyamine Site-Antagonisten wie Ifenprodil, die die Bindung Rezeptor-stimulierender Polyamine hemmen.

- 2 -

Drei Klassen von Glutamat-Rezeptoren (AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren), die jeweils als Glutamat-abhängige Ionenkanäle fungieren, leiten das postsynaptische Signal des wichtigsten erregenden Neurotransmitters Glutamat weiter. NMDA-Glutamat-Rezeptoren sind in Form unterschiedlicher Rezeptor-Subtypen im gesamten Gehirn verbreitet und als entscheidende erregende Neurotransmitter-Rezeptoren für die Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) essentiell.

In den letzten Jahren wurde die Molekularbiologie des NMDA-Glutamat-Rezeptors eingehend untersucht. Dabei zeigte sich, daß diese Rezeptoren aus einer NR1-Untereinheit in Kombination mit einer oder mehreren NR2-Untereinheiten und - seltener - einer NR3-Untereinheit bestehen (Das, S. et al.: Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. Nature 393 (1998), 377-381; Chatterton, J.E. et al.: Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. Nature 415 (2002), 793-798).

Insbesondere die NR2-Untereinheit, von der die vier Formen A-D existieren, aber auch alternative Splice-Varianten der Untereinheit NR1, bestimmen die Pharmakologie des NMDA-Glutamat-Rezeptors. NR1 und NR2A werden im ZNS ubiquitär exprimiert, während NR2B, NR2C und NR2D seltener oder nur in bestimmten Regionen des Gehirns vorkommen. Diese unterschiedliche Zusammensetzung der Rezeptor-Subtypen ermöglicht therapeutische Ansätze mit selektiv wirkenden Antagonisten.

Für die komplexe Aktivierung des NMDA-Glutamat-Rezeptors sind präsynaptisch freigesetztes Glutamat als erregender Neurotransmitter und Glycin als modulierender Neurotransmitter und Co-Agonist verantwortlich. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Einstrom von Calcium-Ionen und ist - insbesondere bei länger andauernder Stimulierung - mit einer Aktivierung komplexer zellulärer Signale verbunden. Diese führen u.a. zu einer Phosphorylierung des CRE-Bindeproteins (CREB) sowie zu einer multiplen

Genaktivierung und synaptischer Plastizität (Neuroplastizität), die eine wesentliche Grundlage für Gedächtnisleistungen und Lernprozesse darstellt.

5 Eine Übersicht über die allgemeine Pharmakologie des NMDA-Rezeptors und der NMDA-Antagonisten gibt die Veröffentlichung von Kemp, J.A. und McKernan, R.M.: NMDA Receptor Pathways as Drug Targets, Nature Neuroscience, Nov. 2002, Vol. 5 Suppl., 1039-1042, deren Offenbarung vollumfänglich in Bezug genommen wird.

10 Eine Überaktivierung des Rezeptors und der damit verbundene erhöhte Ca^{2+} -Einstrom führt hingegen zu einer massiven Störung des Ca^{2+} -abhängigen zellulären Stoffwechsels - einschließlich des Energiestoffwechsels. Für den nachfolgend eintretenden Zelltod wird insbesondere die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger kataboler Enzyme verantwortlich gemacht (Lee, Jin-Mo et al., "The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms"; Dennis W. Zhol "Glutamat neurotoxicity and diseases of the nervous system").
15 Dieser Prozess ist als Exzitotoxizität bekannt.

Da die Exzitotoxizität auf der Überaktivierung des Glutamat-Rezeptors
20 beruht, besitzen Antagonisten des Glutamat-Rezeptors im allgemeinen ein therapeutisches und/oder prophylaktisches Potential für alle ZNS-Erkrankungen oder neuronalen Zustände, bei denen Neuronen durch diesen Prozess bedroht oder geschädigt werden. Zu diesen "Zuständen" gehören ebenso die im Zuge eines Schlaganfalls auftretende cerebrale Ischämie wie
25 auch neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Chorea Huntington, bei denen nicht überschüssiges Glutamat, sondern eine erhöhte Sensibilität gegenüber exzitotoxischer Schädigung die wesentliche Krankheitsursache darstellt. Schließlich stellen auch Erkrankungen wie Epilepsie und neuropathische Schmerzen, die auf einer Überaktivität erregender Signalwege
30 beruhen, mögliche Anwendungsbereiche der Antagonisten des Glutamat-Rezeptors dar.

- 4 -

Weitere Anwendungen erstrecken sich beispielsweise auf die Behandlung von Schmerzzuständen, insbesondere chronischer Schmerzen, die Behandlung von Suchterkrankungen, die Behandlung psychiatrischer Erkrankungen und die Stimulierung der Lern- und Gedächtnisleistung.

5

Antagonisten können den Rezeptor kompetitiv oder nicht-kompetitiv hemmen. Während die kompetitiven Antagonisten einer Rezeptoraktivierung z.B. durch die natürlichen Agonisten Glutamat und Glycin entgegenwirken, hemmen die nicht-kompetitiven Antagonisten den Rezeptor unabhängig von
10 der Gegenwart oder Konzentration der Agonisten - etwa durch das Blockieren des Ionenkanals. Eine kompetitive Hemmung (Antagonisierung) des Glutamat-Rezeptors des NMDA-Typs ist beispielsweise mit 2-Amino-5-Phosphonovalerat (APV) oder 2-Amino-5-Phosphonoheptanoate (APH) möglich. Eine nicht-kompetitive Hemmung kann dagegen durch Substanzen
15 erreicht werden, die an die Phencyclidin-Seite der Kanäle binden, wie Phencyclidin, MK-801, Dextrophan oder Ketamin.

Bislang haben klinische Studien zur Verwendung von NMDA-Antagonisten als Neuroprotektiva insbesondere bei Schlaganfall und traumatischen Hirnverletzungen jedoch noch nicht den gewünschten Erfolg erbracht (Kemp, J.A.; Kew, J.N.C.; Gill, R.: Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 141 (eds. Jonas, P. & Monyer, H.) 495-527 (Springer, Berlin, 1999); Lees, K.R. et al.: Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute STROKE: a randomised controlled trial.
20 GAIN International Investigators. Lancet 355 (2000), 1949-1954; Sacco, R.L. et al. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. JAMA 285 (2001), 1719-1728).

30 Die bisher wenig erfolgreichen Versuche zur Neuroprotektion bei Schlaganfall lassen sich unter anderem vermutlich darauf zurückführen, daß die bekannten Neuroprotektiva notwendigerweise mit Thrombolytika kombiniert

- werden müssen, um zum Ort der Gewebeschädigung vorzudringen und dort ihre Wirkung zu entfalten. Des weiteren können die bekannten NMDA-Glutamat-Rezeptor Antagonisten aufgrund ihrer beträchtlichen Nebenwirkungen in der Regel nicht ausreichend hoch dosiert verabreicht werden, um
- 5 die wunschgemäße Wirkung zu erzielen. In hohen Dosierungen verursachen sie nämlich u.a. Halluzinationen sowie eine deutliche Erhöhung des Blutdrucks. Letzteres ist naturgemäß gerade bei Schlaganfall-Patienten besonders kritisch.
- 10 Des weiteren haben die bekannten Glutamat-Rezeptor-Antagonisten in der für die Neuroprotektion erforderlichen Dosierung häufig eine nicht akzeptable stark betäubende bis narkotische Wirkung. So wurden zahlreiche NMDA-Antagonisten wie Phencyclidin und Ketamin ursprünglich zu Zwecken der Anästhesie und Narkose entwickelt.
- 15 Es wurde daher versucht, diese Nebenwirkungen mit Rezeptor-selektiven NMDA-Antagonisten zu vermeiden. Dabei zeigten sich für den NR2B selektiven Antagonisten Ifenprodil im Tiermodell für Schlaganfall vorteilhafte Wirkungen bei deutlich verminderten Nebenwirkungen (Gotti, B. et al. Ifenprodil
- 20 and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. Evidence for efficacy in models of focal cerebral ischemia. J. Pharmacol. Exp. Ther. 247. (1988), 1211-1221). Eine Zahl weiterer Antagonisten der NR2B-Untereinheit - so z.B. CP-101606, Ro 25-6981 und Ro 63-1908 - ist seither beschrieben worden (Kemp, J.A.; Kew, J.N.C.; Gill, R.: Handbook of Experimental Pharmacology Vol 141 (eds. Jonas, P. & Monyer, H.) 495-527 (Springer, Berlin,
- 25 1999); Gill R. et al.: Pharmacological characterization of RO63-1908 (1-[2-(4-hydroxy-phenoxy)-ethyl]-4-(4-methyl-benzyl)-piperidin-4-01), a novel subtype-selective N-methyl-D-aspartate antagonist. J. Pharmacol. Exp. Ther. 302 (2002), 940-948). Auch diese zeigten im Tiermodell durchaus eine
- 30 neuroprotektive Wirkung bei geringen Nebenwirkungen. Diese positiven Ergebnisse ließen sich in klinischen Studien zur traumatischen Hirnverlet-

- 6 -

zung jedoch nicht bestätigen. Vielmehr versagte CP-101606 wiederholt (Pressemitteilung von Pfizer, Oktober 2001).

Bei der Suche nach einem geeigneten Neuroprotektivum zur Minderung der
5 Zellschädigung bei Schlaganfall besteht zudem das besondere Problem,
daß die Neuroprotektiva mit einem Fibrinolytikum/Thrombolytikum kombi-
niert werden müssen, um die Barriere des Thrombus zu überwinden und in
den Bereich des geschädigten Gewebes vorzudringen (siehe oben). Als
Thrombolytikum wird in der Regel t-PA verabreicht, bei dem es sich um das
10 derzeit einzig für die Schlaganfallbehandlung zugelassene Thrombolytikum
handelt.

Durch die Untersuchungen von Nicole *et al.* ist jedoch bekannt, daß t-PA
eine wichtige Rolle bei der Exzitotoxizität zukommt (Nicole O; Docagne F Ali
15 C; Margail I; Carmeliet P; MacKenzie ET; Vivien D und Buisson A, 2001:
The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA
receptor-mediated signaling; in: Nat Med 7, 59-64). Danach schütten
depolarisierte kortikale Neuronen t-PA aus, das mit der NR1 Untereinheit
des Glutamat Rezeptors des NMDA Typs interagiert und diese spaltet.
20 Damit geht eine Aktivierung der Rezeptoraktivität einher. Die Verabreichung
von t-PA trägt somit zu der zellschädigenden Exzitotoxizität bei. Daraus folgt
eine neurotoxische Wirkung des t-PA. Die Entwicklung eines
Neuroprotektivums für die Prophylaxe und Behandlung von Zellschäden
beim Schlaganfall steht somit vor der besonderen Herausforderung, nicht
25 nur die durch den Schlaganfall bedingten Zellschäden zu mildern, sondern
auch möglichst diejenigen Schäden zu berücksichtigen, die durch die Gabe
des Therapeutikums zur Wiedereröffnung der Gefäße verursacht oder
verstärkt werden.

30 Es ist somit die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine alternative Mög-
lichkeit zur Behandlung und Prophylaxe neurologischer Schäden bereitzu-
stellen.

- 7 -

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von Substanzen als Neuroprotektiva, die die t-PA Aktivität hemmen. Der Begriff "Hemmung" umfaßt in diesem Zusammenhang alle Effekte, die zu einer Verringerung bzw.

5 Reduktion der t-PA Aktivität führen. Dabei kann es sich beispielsweise um eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung, einen beschleunigten Abbau des t-PA oder aber auch um eine Reduktion (Suppression) der t-PA Expression handeln. Der Begriff Hemmstoff bezieht sich entsprechend auf alle Substanzen, die eine Reduktion der t-PA Aktivität in der Zelle verursachen.

10

Die t-PA Aktivität wird insbesondere als die Aktivierung des Glutamat-Rezeptors, vorzugsweise des Glutamat-Rezeptors des NMDA-Typs definiert. Die Verminderung der Aktivierung des Glutamat-Rezeptors durch das

15 Neuroprotektivum wird vorzugsweise durch die Bestimmung des Ca^{++} Einstroms in die Zellen des betroffenen Gewebes ermittelt unter Gabe des Neuroprotektivums. Ein Assay zur Darstellung des Ca^{++} ist dem Fachmann bekannt und unter Beispiel 3 in Ziffer II angegeben.

20 Hemmstoffe des t-PA sind umfangreich bekannt. So ist beispielsweise bekannt, daß die Aktivität des t-PA durch den Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) reguliert wird. Ebenso kann t-PA durch die Proteasen Neuroserpin oder Protease Nexin I (PN-1) inhibiert werden. Bei diesen Inhibitoren handelt es sich jeweils um Serin-Protease-Inhibitoren, die im

25 physiologischen Kontext t-PA hemmen. Erfindungsgemäß werden sie jedoch als Neuroprotektiva eingesetzt.

Es ist erfindungsgemäß auch möglich, die t-PA Aktivität mittelbar über die Erhöhung der Transkriptionsrate der physiologischen Hemmstoffe zu reduzieren. So kann beispielsweise TGF- β (transforming growth factor β) verabreicht werden, von dem bekannt ist, daß er die Transkription von PAI -1 stimuliert.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Plasminogen Aktivierende Faktor DSPA (Desmoteplase) als Neuroprotektivum eingesetzt, insbesondere zur Behandlung von den auf die Exzitotoxizität zurückgehenden (pathologischen) Zuständen. DSPA mit seinen Isoformen ist unter anderem in den Patentschriften US 5,830,849 sowie US 6,008,019 ausführlich beschrieben. Die rekombinante Herstellung des DSPA ist in der US Patenschrift 5,731,186 offenbart. Diese Druckschriften werden zu Zwecken der Offenbarung der Struktur, der Funktion und der Bereitstellung des DSPA vollumfänglich in Bezug genommen.

Die Primärstruktur einer besonders bevorzugt verwendeten Isoform der Desmoteplase ist in der Fig. 1 dargestellt (DSPA $\alpha 1$). Allerdings können erfindungsgemäß auch andere funktionsgleiche DSPA-Isoformen eingesetzt werden. Diese sind ebenfalls in den oben genannten US Patenten offenbart. Diese Plasminogen Aktivierenden Faktoren werden nachfolgend einheitlich als DSPA oder Desmoteplase bezeichnet, ohne daß damit eine Begrenzung auf DSPA $\alpha 1$ verbunden wäre.

Erfindungsgemäß kann sowohl das native gereinigte DSPA als auch rekombinant hergestelltes DSPA eingesetzt werden. Ebenso können Derivate oder Fragmente des DSPA eingesetzt werden, sofern sie die neuroprotektiven Wirkungen des DSPA zeigen. Der Begriff "DSPA" wird vorliegend daher als Oberbegriff für natives oder rekombinantes DSPA sowie deren im wesentlichen funktionsgleichen Derivate, Analoga oder Fragmente verstanden.

Unter den Begriffen "Derivate, Analoga oder Fragmente" des DSPA werden insbesondere alle Proteine oder Peptide subsumiert, die funktionell die charakteristischen Eigenschaften des nativen DSPA vor allem die gegenüber dem nativen t-PA erhöhte Fibrinspezifität aufweisen. Die gegenüber dem t-PA erhöhte Fibrinspezifität des DSPA ist aus der WO 03/037363 bekannt. Vorzugsweise weisen die DSPA-Derivate und Analoga eine mindestens 70

%-ige, vorzugsweise eine mindestens 80-90 % Homologie zu der Aminosäuresequenz des DSPA gemäß Fig. 1 auf.

Die überraschende erfindungsgemäße neuroprotektive Wirkung des DSPA wurde in Tierversuchen und in *in vitro*-Versuchen identifiziert, in denen gezeigt werden konnte, daß DSPA nicht nur keine neurotoxische, sondern auch eine neuroprotektive Wirkung hat, indem es der neurotoxischen Wirkung von t-PA entgegenwirkt. Es wurde darin erkannt, daß DSPA als Antagonist zum t-PA wirkt. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen von DSPA auch dann zu einer Verminderung der durch NMDA induzierten neuronalen Schädigungen führen, wenn es allein – d.h. ohne eine externe Gabe von t-PA – appliziert wurde.

Zur experimentellen Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung des DSPA wurden Kulturen isolierter kortikaler Neuronen aus Mäuse-Foeten mit NMDA behandelt, um damit den neuronalen Zelltod zu induzieren. Zusätzlich zu NMDA enthielten die Kulturmedien unterschiedliche Mengen t-PA und/oder DSPA. Diese *in vitro*-Versuche zeigen, daß t-PA eine Potentierung des durch NMDA ausgelösten Zelltodes bewirkt, während DSPA diesen Effekt nicht verursacht (Fig 2). Wurde DSPA dagegen gemeinsam mit t-PA appliziert, verminderte sich der NMDA-induzierte Zelltod im Vergleich zu t-PA allein signifikant (Fig. 3). Dabei wurde zudem deutlich, daß DSPA konzentrationsabhängig die durch t-PA verstärkte neurale Zellschädigung deutlich reduzieren kann.

Des weiteren wurden Untersuchungen zur Bestimmung des Ca^{++} -Einstroms bei einer vorherigen Gabe von DSPA bzw. t-PA durchgeführt, da die Verminderung des durch die Aktivierung des Glutamat-Rezeptors verursachten Ca^{++} -Einstroms bekanntermaßen als Indikator für die Neuroprotektivität der jeweiligen Testsubstanz gilt. Auch in diesen Versuchen bestätigte sich die Neuroprotektivität des DSPA, da DSPA den Ca^{++} -Einstrom in die Zelle nicht erhöhte und der schädigenden Wirkung des t-PA entgegenwirkte (Fig. 4).

Der Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung des DSPA ist noch nicht abschließend verstanden. Er könnte aber möglicherweise darauf beruhen, daß DSPA zwar wie t-PA an den Glutamat-Rezeptor bindet, diesen aber
5 nicht spaltet und somit nicht aktiviert. DSPA würde so selber nicht zur Exzitotoxizität beitragen und möglicherweise die Aktivierung des Rezeptors durch t-PA blockieren.

Die Eignung des DSPA als Neuroprotektivum ist insbesondere vor dem
10 Hintergrund der seit 1995 bekannten Neurotoxizität des t-PA überraschend. Da DSPA und t-PA eine erhebliche funktionelle und strukturelle Übereinstimmung aufweisen, war daher nämlich zu erwarten, dass auch DSPA neurotoxisch ist.

15 Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Verwendung des DSPA oder dessen Derivate oder Fragmente basiert darauf, daß aufgrund der überraschenderweise gefundenen neuroprotektiven Wirkung von DSPA ein Therapeutikum eingesetzt werden kann, daß sowohl fibrinolytische als auch neuroprotektive Eigenschaften aufweist.

20 Dieser Vorteil wirkt sich insbesondere bei der Schlaganfallbehandlung aus, da die mit dem Schlaganfall verbundenen Gewebeschädigungen u.a. auf die neurotoxischen Nebenwirkungen des körpereigenen sowie des ggf. zu therapeutischen Zwecken verabreichten t-PA zurückzuführen sind. Durch die
25 neuroprotektive Wirkung des DSPA kann diesen schädigenden Effekten des t-PA mindestens entgegengewirkt werden.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann DSPA
30 daher als Neuroprotektivum bei der Behandlung des Schlaganfalls in Kombination mit einem Thrombolytikum, beispielsweise t-PA, verabreicht werden. So kann der therapeutische Vorteil des t-PA für den Patienten genutzt und gleichzeitig dessen neurotoxische Nebenwirkungen durch DSPA als

Neuroprotektivum neutralisiert, oder aber mindestens abgeschwächt werden.

Die erfindungsgemäß als Neuroprotektiva einsetzbaren Substanzen können
5 für die Behandlung einer Vielzahl pathologischer Zustände verwendet werden (siehe oben). Zu den Anwendungsmöglichkeiten gehören die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, Chorea Huntington und Diabetes, die Behandlung von Schmerzzuständen, die
10 Behandlung von Suchterkrankungen, die Behandlung neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wie Epilepsie, motorische Störungen, Depressionen, Angstzustände und Gedächtnisstörungen, eine allgemeine Verbesserung kognitiver Leistungen sowie die Behandlung von Amyotropher Lateralsklerose. Bei der Pathogenese dieser Erkrankungen bzw. Zustände spielt
15 die Überaktivierung des NMDA-Glutamat-Rezeptors jeweils eine bedeutende Rolle.

Die therapeutische Effektivität der erfindungsgemäß einsetzbaren Neuroprotektiva auf den affektiven Zustand von Patienten konnte bereits in ersten
20 klinischen Untersuchungen gezeigt werden. In dieser Studie wurden die mit DSPA behandelten Patienten in ihrem affektiven Zustand (Depressionen und Angstzustände) erfaßt.

Der Terminus "Depression" wird vorliegend umfassend definiert, d.h. er erfaßt alle affektiven oder mentalen Störungen, die nicht als adäquate Reaktion
25 auf äußere Bedingungen angesehen werden können, unabhängig von den physiologischen oder psychologischen Hintergründen ihrer Entstehung. Der Begriff "Depression" umfaßt insbesondere auch Angstzustände. Folglich bezieht sich der Begriff "Anti-Depressivum" umfassend auf ein Therapeutikum zur Behandlung dieser Störungen.

30 Die klinische Studie wurde zur Evaluierung der klinischen Wirkung und Sicherheit des DSPA $\alpha 1$ in akutem ischämischen Schlaganfall durchgeführt

(*Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke*, nachfolgend DIAS-Studie). Dabei handelt es sich um eine placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie der Phase II, bei der DSPA den Patienten innerhalb eines 3- bis 9-stündigen Zeitraums nach dem Einsetzen der Schlaganfallsymptome intravenös appliziert wurde.

Im ersten Teil der Studie nahmen 46 Patienten teil, die danach ausgewählt wurden, ob ihre vom Schlaganfall betroffenen Gehirnbereiche irreversibel geschädigt oder aber die teilgeschädigten bzw. gefährdeten Gehirnbereiche noch zu retten waren. Lediglich diejenigen Patienten wurden in die Studie aufgenommen, bei denen vorgeschädigte Gehirnbereiche durch Reperfusion mittels eines Thrombolytikums potentiell gerettet werden können. Die Auswahl der Patienten erfolgte über MRI (*Magnetic Resonance Imaging*).

Von den 46 untersuchten Patienten wurden 16 Patienten mit Placebo behandelt. Die übrigen 30 erhielten ein Desmoteplase-Präparat, wobei 17 Patienten mit 25 mg des Wirkstoffs und 13 Patienten mit 37,5 bzw. 50 mg behandelt wurden.

Mehr als 56 % der placebobehandelten Patienten klagten über Depressionen. Diese Depressionen wurden zwar von dem jeweiligen behandelnden Arzt als Depression klar diagnostiziert, eine eindeutige Zuordnung zu einer spezifischen Erscheinungsform der Depressionen konnte jedoch aufgrund fehlender weiterführender Informationen nicht vorgenommen werden. Dieses depressive Syndrom wurde daher von den behandelnden Ärzten jeweils als "Depression NOS", nämlich als "*not otherwise specified*" kategorisiert.

Während demnach mehr als die Hälfte der placebobehandelten Patienten diese unspezifizierten Depressionen zeigte, lag der Anteil der davon betroffenen Patienten in der vergleichbaren Desmoteplase-behandelten Gruppe bei insgesamt nur 16,7 %.

Im zweiten Teil der Studie nahmen 56 Patienten teil, die u.a. mit 62 µg/kg, 90 µg/kg, 125 µg/kg DSPA oder mit Placebo behandelt wurden. Die Ergebnisse des zweiten Teils der Studie bestätigten die Ergebnisse des ersten Teils sowohl hinsichtlich der Reperfusion als auch hinsichtlich der Senkung der Depressionshäufigkeit.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist für DSPA α1 eine Dosierung von größer 60 und kleiner 160 µg/kg, insbesondere von 90 bis 125 µg/kg zur Behandlung affektiver Störungen bevorzugt. Eine Reduktion der affektiven Störungen ist jedoch auch bei höheren Dosierungen möglich.

Bei der Verwendung anderer DSPA-Isoformen oder aber von DSPA-Derivaten, Analoga oder Fragmenten kann die Dosierung davon abweichen. Die Dosierung wird in diesen Fällen vorteilhafterweise ausgehend von der jeweiligen Bioäquivalenz der verwendeten Substanz angepaßt.

Diese niedrige Dosierung ist insbesondere bei einer Depression nach Schlaganfall (Post-Stroke Depression) vorteilhaft, bei der eine Einmalbehandlung mittels i.v. Bolus Verabreichung erfolgt. Dann können bereits 90 µg/kg DSPA ausreichend sein. Bei (sub)chronischen Anwendungen können weitaus niedrigere Dosierungen genügen. Dies gilt vor allem für erfindungsgemäß eingesetzte t-PA Hemmstoffe, die zu einer Supprimierung der endogenen t-PA Produktion führen. Bei Hemmstoffen, die eine kompetitive Hemmung am NMDA Rezeptor verursachen, sind dagegen die oben aufgeführten Dosierungen bevorzugt. Für weniger akute Krankheitsbilder sind s.c., orale oder inhalative Formulierungen vorteilhaft.

Die Bedeutung des t-PA für den affektiven Zustand und das Lernverhalten des Menschen ist bekannt. So spielt t-PA beim gesunden Menschen eine positive Rolle beim Lernverhalten (Pawlak 2002 und 2003). Ebenso ist aus Untersuchungen an t-PA-defizienten Mäusemutanten bekannt, daß t-PA im Mandelkörper einen kritischen Faktor für streßinduzierte Angstzustände dar-

stellt (Pawlak et al. 2003) und bei der Induktion von Angst wesentlich ist (Pawlak 2003). Die Entstehung einer Depression scheint dagegen im Zusammenhang mit der sog. neuronalen Plastizität zu stehen, mit der der Körper auf Streß wie beispielsweise Verletzungen reagieren kann. Dieser
5 Prozeß wird nach dem bisherigen Erkenntnissen u.a. durch die t-PA vermittelte Glutamatrezeptor Aktivierung reguliert.

Zusammenschauend ergibt sich aus den bekannten Untersuchungen, daß das durch Streß oder Verletzungen freigesetzte körpereigene t-PA ein
10 Signal für die postsynaptische Zelle darstellt und als "Trigger" für plastische neuronale Veränderungen wirkt.

Bei dem der Neuroplastizität zugrundeliegenden Mechanismus handelt es sich vermutlich um die sogenannte *long term potentiation (LTP)* sowie die
15 *long term depression (LTD)*. Die LTP wird durch eine hochfrequente Anregung der Neuronen und die dadurch ausgelöste erhöhte Depolarisation induziert. Diese Langzeitpotenzierung beruht auf der glutamatabhängigen Aktivierung von NMDA-Glutamat-Rezeptoren, die zu einer erhöhten Ca^{++} -Freisetzung führt. Die erhöhte Calcium-Konzentration bewirkt eine erhöhte
20 Effektivität der Synapse und erlaubt damit eine Anpassung an die jeweiligen Umstände.

Die LTD kann als "Kompensation" einer vorangegangenen LTP oder auch *de novo* durch niedrig-frequente Elektro-Stimulation induziert werden. So
25 wie die LTP basiert der Mechanismus auf der Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren des NMDA-Typs. Diese führt jedoch zu einem moderaten Ca^{++} -Influx und damit zu einer nur reduzierten synaptischen Effektivität. Diese verursacht Depressionen.

30 Nun ist bekannt, daß t-PA an den Glutamat-Rezeptor des NMDA-Typs bindet, diesen spaltet und somit aktiviert. Hierin könnte die bei Pawlak et al. beobachtete Beeinflussung der neuronalen Plastizität durch t-PA begründet

sein. In Abhängigkeit von der Menge des ausgeschütteten t-PA wäre sowohl die Entstehung einer Langzeitpotenzierung als auch einer Langzeitdepression erklärbar.

- 5 Aus den dargestellten Untersuchungen zu der erfindungsgemäßen neuroprotektiven Wirkung des DSPA läßt sich somit ableiten, daß DSPA als Antagonist die Aktivierung des NMDA-Glutamat-Rezeptors blockiert und damit im Ergebnis einer Langzeitdepression entgegenwirken kann.
- 10 Die unterschiedliche Wirkung von DSPA und t-PA auf die synaptische Aktivität - und damit auf LTP und/oder LTD - wird auch durch Calcium-Mobilisationsexperimente an neuronalen Zellen deutlich (siehe oben). Diese *in vitro*-Versuche zeigen, daß die Behandlung neuronaler Zellen mit t-PA zu einer NMDA-abhängigen Calcium-Freisetzung führt, während dieselbe
- 15 Behandlung mit DSPA keinen Einfluß auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration hatte (s. Fig. 4). Der durch t-PA verursachte Konzentrationsanstieg betrug 30 % gegenüber der Kontrollgruppe.

20 **Ausführungsbeispiele**
I. Klinische Studie (DIAS)

Die Ergebnisse der DIAS Studie bezüglich der DSPA-Wirkungen auf affektive Störungen (Depression und Angstzustände) sind in Fig. 5 zusammen-

25 gefaßt.

II. *in vitro*-Untersuchungen an murinen corticalen Neuronen

Kultur primärer corticaler Säuger-Neuronen:

30

Schwangere Swiss White-Mäuse (Zentrales Tierhaus der Monash University) wurden am Tag 14-16 der Schwangerschaft getötet und die Gebärmutter

ter entnommen. Die Foeten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, der Kopf abgetrennt, das Gehirn frei präpariert und die cerebralen Neocortices unter einem Sektionsmikroskop (Industrial and Scientific Supply Co.) durch Mikrosektion präpariert. Die Sektion wurde über Eis in Hank's Balance

5 Salzlösung (HBSS; 137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 4.10 mM NaHCO₃, 44 mM KH₂PO₄, 0.13 mM NaHPO₄, 10 mM HEPES, 1mM Pyruvat, 13 mM D(+)-Glucose und 0.001 g/L Phenolrot) enthaltend 3 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA) und 1.2 mM MgSO₄ (pH 7.4) durchgeführt. Meningen und Blutgefäße wurden sorgfältig entfernt. Das Gewebe wurde mit der Spitze einer

10 Plastikpipette in kleine Stücke zerkleinert und kurz bei einer Stärke von 1000 g zentrifugiert, um die Fragmente zu sammeln. Das Pellet der Fragmente wurde in warmem (37°C) HBSS (mit 3 mg/ml BSA und 1.2 mM MgSO₄) enthaltend Trypsin (0.2 mg/ml) und Desoxyribonuclease I (DNase I, 880 U/ml) resuspendiert und für 5 min bei 37°C im Schüttler-Wasserbad inkubiert. Der

15 Verdau der Fragmente wurde durch die Zugabe eines gleich großen Volumens HBSS (mit 3 mg/ml BSA) enthaltend Trypsin Inhibitor (83.2 µg/ml), DNase I (880 U/ml) und MgSO₄ (1.22 mM) gestoppt und für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und HBSS enthaltend Trypsininhibitor (0.52 mg/ml), DNase I (880 U/ml) und MgSO₄ (2.7 mM)

20 wurde zum Pellet dazugegeben. Das Gewebe wurde durch Trituration aufgebrochen (15 Stöße mit einer Kaliber 24 Nadel) und 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Zellen in Neurobasal™ Medium (Invitrogen, USA; NBM) enthaltend 2% B27 Supplement (Invitrogen, USA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml

25 Streptomycin, 0.5 mM L-Glutamin und 10% dialysiertes foetales Kälberserum (dFCS), im folgenden als Voll-NBM bezeichnet, resuspendiert. Die Zelldichte der Suspension und Kulturausbeute wurde durch wiederholte Zellzählung in Hämocytometer-Kammern ermittelt. Die Zellen wurden jeweils in Nunc™ (Denmark) 24- oder 96-Proben Platten bei Dichten von 0.3×10^6

30 oder 0.12×10^6 Zellen/Probenkammer angeimpft, was als *in vitro* Dauer von 0 Tagen (0 div) definiert wurde. Die Platten waren zuvor mit poly-D-Lysin (50 µg/ml) beschichtet worden, um die Zellanhaftung zu fördern. Diese

- 17 -

Beschichtung wurde nach einer Übernacht-Inkubation bei 37°C entfernt. Nach 24 h (1 Zellteilung) wurde das Voll-NBM durch dFCS-freies Voll-NBM (2.5% B27 Supplement) ersetzt. Alle 3-4 Teilungen wurde die Hälfte des Serum-freien Voll-NBM ersetzt. Die Zellen wurden in einem befeuchteten
5 CO₂-Inkubator bei 37°C gehalten und mittels invertierter Phasenkontrast-Mikroskopie (Olympus, IMT-2) untersucht. Um die Morphologie der Zellkulturen im Laufe der Zellschädigung zu dokumentieren, wurden Photographien (Kodacolor Gold 100 ISO Film) aufgenommen. Alle Arbeitsschritte wurden - wenn nicht anders vermerkt - bei Raumtemperatur
10 durchgeführt.

1. Effekt von t-PA und DSPA auf den durch NMDA induzierten neuronalen Zelltod

15 Zur Überprüfung einer Erhöhung NMDA-induzierten Zelltods durch t-PA und DSPA wurde den gemäß dem obigen Protokoll kultivierten kortikalen Neuronen NMDA (30 µM oder 70 µM) zugegeben und die Kulturen für weitere 24 h inkubiert. Das Ausmaß des induzierten Zelltods wurde durch die Bestimmung der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) gemessen, wobei eine
20 vollständige Lyse mit TX-100 als Vergleich dient (Fig. 2). Im folgenden wurde das NMDA bei Anwesenheit jeweils steigender Konzentrationen an t-PA (5, 50, 250, 500 nM) oder DSPA (5, 50, 500 nM) den Kulturen zugegeben und der Zelltod in analoger Weise bestimmt.

25 Die Zugabe von 30 µM oder 70 µM NMDA führt zu signifikantem Zelltod (siehe Fig. 2) bei beiden NMDA-Konzentrationen. Bei Anwesenheit steigender Konzentrationen an t-PA ist eine erhöhte Rate des induzierten Zelltods zu beobachten, jedoch nur bei der jeweils höchsten t-PA-Konzentration von 500 nM (siehe Fig. 2). Demgegenüber ist bei DSPA keine Verstärkung des
30 NMDA-induzierten Zelltods, insbesondere bei hoher DSPA-Konzentration sogar eine Reduzierung des durch NMDA induzierten Zelltods zu beobach-

ten. In Abwesenheit von NMDA wird weder durch t-PA noch durch DSPA neuronaler Zelltod induziert (siehe Fig. 2).

2. Verminderung des t-PA induzierten Zelltodes durch DSPA

5

In weiteren *in vitro*-Experimenten wurde festgestellt, ob die Zugabe von DSPA der durch t-PA ausgelösten Verstärkung des NMDA-induzierten Zelltods entgegen wirken kann. Dazu wurden jeweils 70 μ M NMDA zu Primärkulturen kortikaler Neuronen in Gegenwart einer konstanten t-PA-Konzentration von 500 nM und steigender DSPA-Konzentrationen von 5, 50 und 500 nM gegeben (Fig. 3). Das Ausmaß der in den Kulturen auftretenden Zellschädigung wird wiederum nach 24 h Inkubation anhand der freigesetzten Menge an Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt.

10

15

Es wurde jeweils NMDA (70 μ M) bei einer konstanten t-PA-Konzentration von 500 nM und steigenden DSPA-Konzentrationen (5, 50, 500 nM) zu einer Primärkultur kortikaler Neuronen gegeben und der neuronale Zelltod nach 24 h anhand der freigesetzten LDH-Menge bestimmt. Dabei zeigt sich bei steigender DSPA-Konzentration eine Inhibition der t-PA-abhängigen Stimulierung des induzierten neuronalen Zelltodes.

20

3. Ca^{++} -Mobilisationsexperiment

25

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde durch einen Essay mit Fluo-3/AM untersucht. Dazu wurden cortikale Neuronen für 9 Tage kultiviert (siehe oben) und mit 10 μ M Fluo-3/AM in HEPES-gepufferter Salzlösung beladen. Diese Salzlösung enthielt 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,62 mM MgSO_4 , 1,8 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES und 6 mM Glucose, pH 7,4 bei 37° C für eine Stunde. DMSO (1 %) und 0,2 % Pluronic F-127 wurden hinzugefügt, um die Dispersion der Farbe zu erleichtern.

30

Die Zellen wurden mit dem oben angeführten HEPES-Puffer gewaschen, der 1 mM Furosemid enthielt, um das Austreten der Farbe aus dem Puffer (die in jedem Puffer danach eingesetzt wurde) zu verhindern. Die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) der Zellen wurden nach dem Waschen ermittelt, um damit eine Basislinie zu erhalten, und während der Behandlungsdauer (5 Minuten) bei 485/530 nm (Anregung/Emission). Dazu wurde ein Fluoroskan Ascent Fluorometer (Labsystems) verwendet.

Wie in Fig. 4 gezeigt, verursachte die NMDA-Behandlung allein einen signifikanten Anstieg der Calcium-Konzentration nach einer Minute ($P < 0,05$). Diese Calcium-Konzentrationen wurden noch erhöht um 30 %, wenn die Zellen vor der NMDA-Gabe für fünf Minuten mit t-PA (30 µg/ml; 500 nM; $P < 0,05$) vorbehandelt wurden.

Diese Ergebnisse entsprechen dem Bericht von Nicole et al. 2001, in denen die vorherige Gabe von t-PA die Calcium-Freisetzung durch NMDA noch erhöhte. Die Behandlung mit t-PA allein verursachte keine Änderung der Konzentration an freien Calcium-Ionen. Eine fünfminütige Vorbehandlung der neuronalen Zellen mit DSPA vor der Gabe von NMDA veränderte dagegen die Calcium-Konzentration nicht über ein Maß hinaus, das mit NMDA-Gabe allein erreicht wurde. DSPA allein hatte daher keine Wirkung auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration.

Referenzliste:

- Chatterton, J.E. et al.: Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415 (2002), 793-798
- Das, S. et al.: Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393 (1998), 377-381;
- Dennis W. Zhol "Glutamat neurotoxicity and deseases of the nervous system"
- Gill R. et al.: Pharmacological characterization of RO63-1908 (1-[2-(4-hydroxy-phenoxy)-ethyl]-4-(4-methyl-benzyl)-piperidin-4-01), a novel sinotype-selective N-methyl-D-asparatate antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002), 940-948
- Gotti, B. et al. Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. Evidence for efficacy in models of focal cerebral ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247 (1988), 1211-1221.
- Kemp, J.A. und McKernan R.M.: NMDA Receptor Pathways as Drug Targets, *Nature Neuroscience*, Nov. 2002, Vol. 5 Suppl., 1039-1042
- Kemp, J.A.; Kew, J.N.C.; Gill, R.: *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 141 (eds. Jonas, P. & Mönner, H.) 495-527 (Springer, Berlin, 1999);
- Lee, Jin-Mo et al., "The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms";
- Lees, K.R. et al.: Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute STROKE: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. *Lancet* 355 (2000), 1949-1954;
- Nicole O., Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie E. T., Vivien D., Buisson A., 2001: The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling, *Nat. Med.* 7, 59-64
- Pawlak R., Magarinos A. M., Melchor J., McEwen B., Strickland S., 2003: Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced

- 21 -

anxiety-like behavior, nature neuroscience, 6 (2), 168-174

- Pawlak R., Nagai N., Urano T., Napiorkowska-Pawlak D., Ihara H., Takada Y., Collen D. Takada A., Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-Plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice, 2002, Neuroscience, 113(4), 995-1001
- Pressemitteilung von Pfizer, Oktober 2001).
- Sacco, R.L. et al. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. JAMA 285 (2001), 1719-1728

- 22 -

Patentansprüche:

- 5 1. Verwendung eines Hemmstoffs der t-PA vermittelten Aktivierung des Glutamat-Rezeptors, vorzugsweise des NMDA-Typs, als Neuroprotektivum.
- 10 2. Verwendung eines Hemmstoffs nach Anspruch 1 zur Behandlung oder Prophylaxe von auf der Exzitotoxizität des Glutamatrezeptors basierender neuronaler Schädigungen oder Zustände.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Behandlung von Depressionen oder Angstzuständen.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **gekennzeichnet durch** den Einsatz bei der Schlaganfallbehandlung.
- 20 5. Verwendung nach einer der Ansprüche 1 oder 2, **gekennzeichnet durch** die Behandlung oder Prophylaxe eines der folgenden Zustände: Parkinson, Alzheimer, Chorea Huntington, Diabetes, Schmerzzustände, Epilepsie oder Gedächtnisstörungen.
- 25 6. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, **gekennzeichnet durch** den Einsatz einer die t-PA Aktivität hemmenden Protease.
- 30 7. Verwendung nach Anspruch 6, **gekennzeichnet durch** einen Serin Protease-Inhibitor, vorzugsweise Neuroserpin, Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) oder Protease Nexin I (PN-1).

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von DSPA oder funktionell und/oder strukturell daraus ableitbarer Derivate, Analoga oder Fragmente.
- 5 9. Verwendung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß DSPA mit einer Aminosäuresequenz gemäß Fig. 1 oder DSPA-Derivate, Analoga oder Fragmente mit einer mindestens 70%-igen, vorzugsweise eine 80 bis 90 %-igen Homologie dazu verwendet werden.
- 10 10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9, **gekennzeichnet durch** eine Dosierung von größer 62, 5 und kleiner 160 µg/kg DSPA gemäß Fig. 1, vorzugsweise von 90 bis 125 µg/kg DSPA, besonders bevorzugt 90 µg/kg DSPA oder einer je nach der Bioäquivalenz des verwendeten Derivats, Analogons oder Fragments dazu angepaßten Dosierung.
- 15 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß DSPA oder Derivate, Analoga oder Fragmente davon als Neuroprotektivum bei der Schlaganfallbehandlung in Kombination mit einem Thrombolytikum eingesetzt wird.
- 20 12. Verwendung nach Anspruch 11, **gekennzeichnet durch** t-PA als Thrombolytikum.

Fig. 1

MVNTMKTKLL CVLLLOGAVF SLPRQETYPQ LARGSRAYGV ACKDEITQMT YRRQESWLRP
EVRSKRVEHC QCDRGQARCH TVPVNSCSEP RCFNGGTCWQ AVYPSDFVCQ CPAGYTGKRC
EVDTRATCYE GQGVITYRGTW STAESRVECI NWNSSLLTRR TYNGRMPDAF NLGLGNHNYC
RNPNGAPKFW CYVIKAGKFT SESCSVPVCS KATQGLRKYK EPQLESTGGL FIDITSHPWQ
AAIFAQNRRS SGERFLOGGI LISSCWVLT AHCFOESYLP DQKVVLGRT YRVKPGEEEQ
TFKVKRYIVH KEFDDDTYNN DIALQLKSD SPQCAQESDS VRAICLPEAN LQLPDWTECE
LSGYGKHKSS SPFYSEQLKE GHVRLYPSSR CAPKFLFNKT VTNMLCAGD TRSGEITYNV
HDACQGDSSG PLVCMNDNHM TLGIIISWGV GCGEKDVPGV YTKVINYLGW IRDNMEL

Fig. 2

Potenenzierung der NMDA-induzierten Neurotoxizität in vitro durch rt-PA, nicht aber durch DSPA

LDH Freisetzung (bezogen auf 100 % Zelltod)

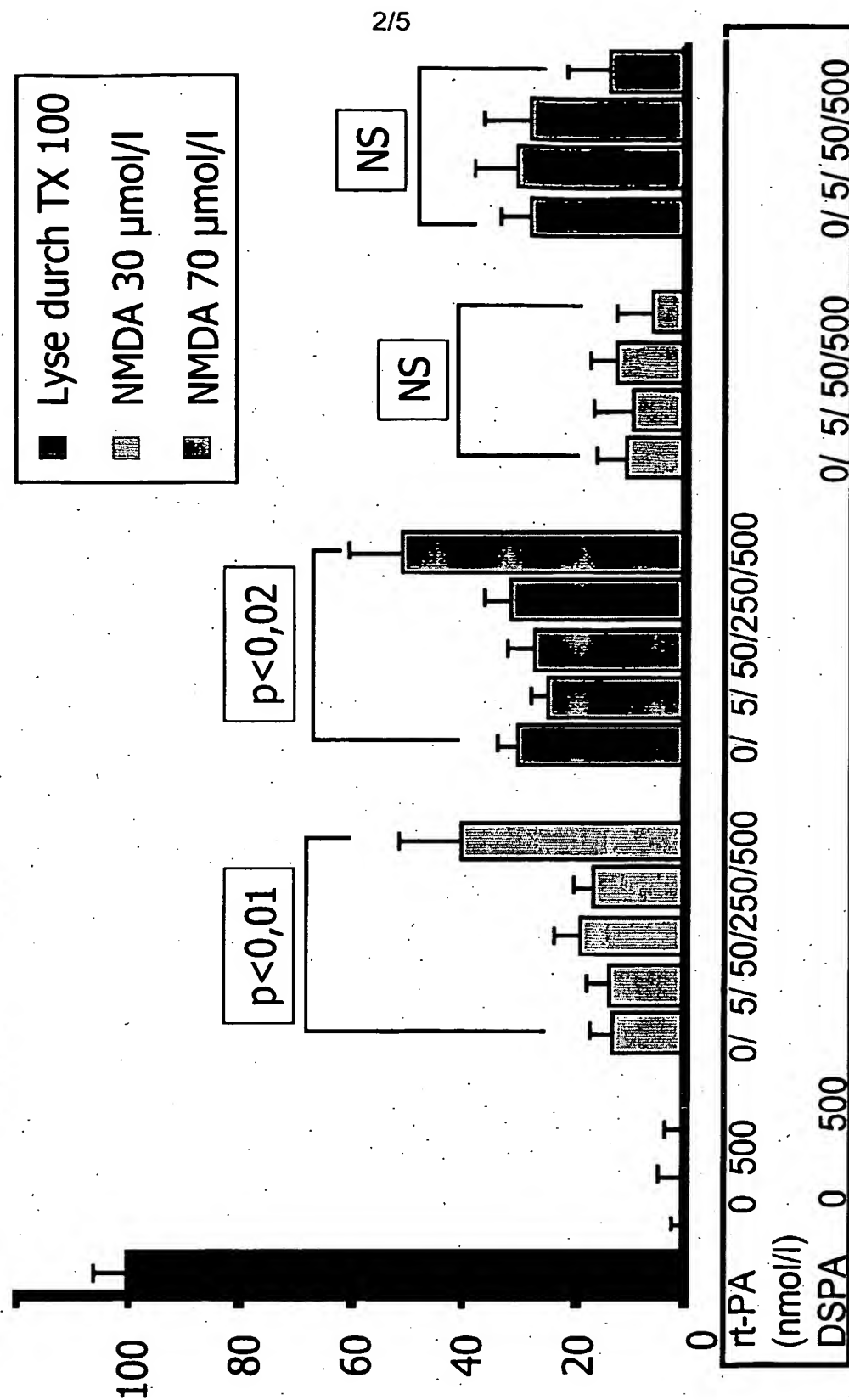


Fig. 3

Die Potenzierung der NMDA-induzierten Neurotoxizität durch rt-PA wird durch DSPA antagonisiert

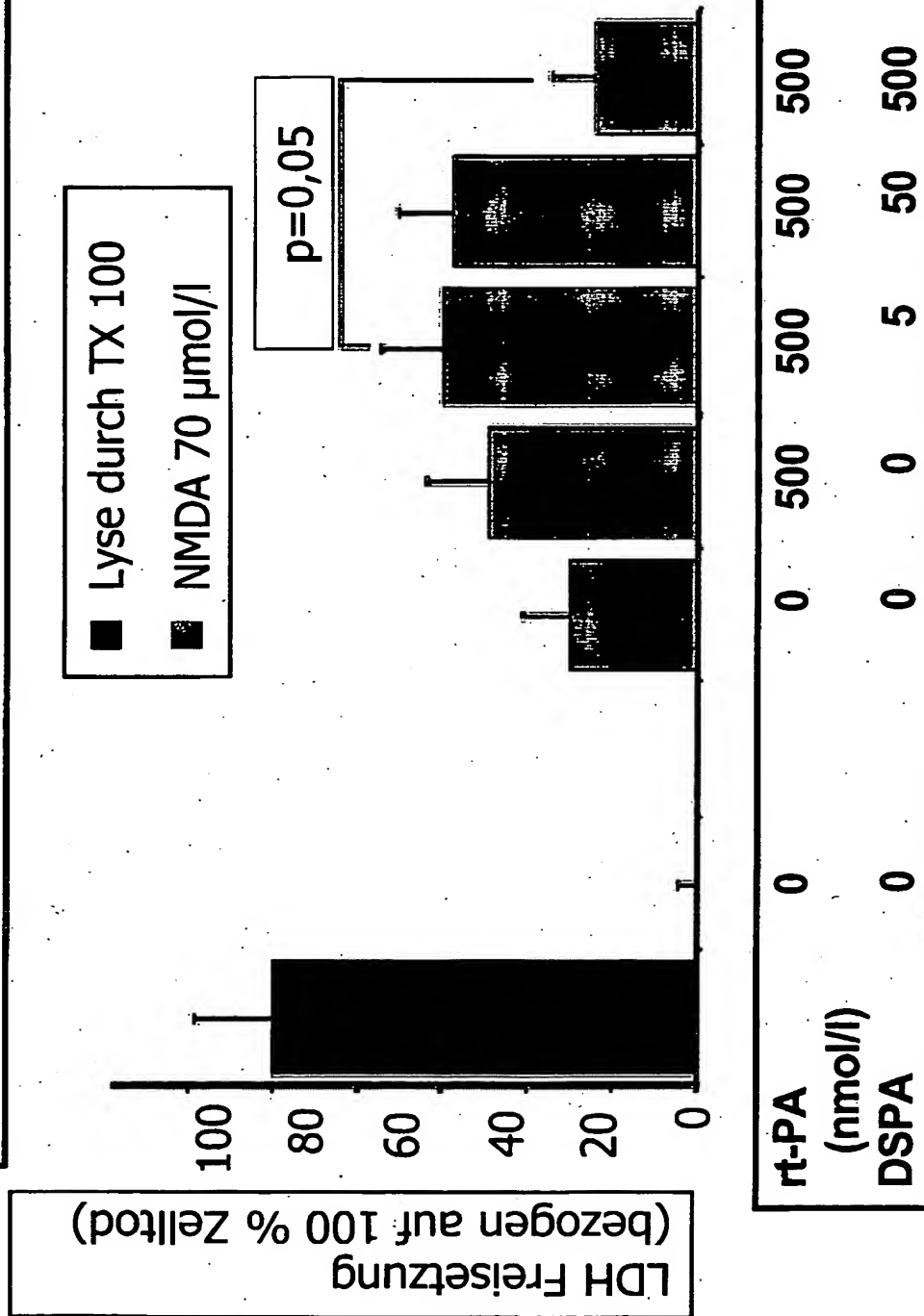


Fig. 4

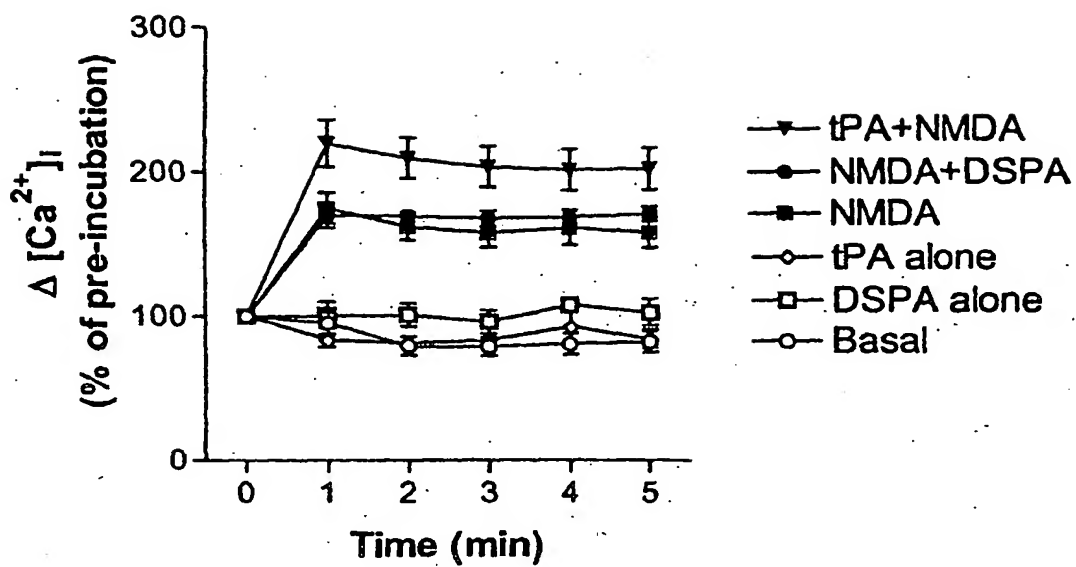


Fig. 5

